

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/10, A61K35/28, A61K35/407, A61P1/16, A61P43/00, C12N15/54

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/10, A61K35/28, A61K35/407, A61P1/16, A61P43/00, C12N15/54

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), PUBMED

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALISON M.R. et al., Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells, Nature (2000), Vol.406, page 257	10,12,13
X	PETERSEN B.E. et al., Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Ocal Cells, Science (1999), Vol.284, pages 1168 to 1170	12,13
X	TUAN R.S. et al., Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, Arthritis Research and Therapy (2002), Vol.5, No.1, pages 32 to 45	12,13
X	BARRY F.P. et al., Biology and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells, Birth Defects Research Part C (2003-Aug-25), Vol.69, pages 250 to 256	14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 April, 2004 (07.04.04)Date of mailing of the international search report
27 April, 2004 (27.04.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002440

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002440

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-9, 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions according to claims 1 to 9 and 11 relate to methods of transplanting mesenchymal stem cells into a mammal suffering from chronic liver injury and involve humans as the mammal. Thus, they pertain to methods for treatment of the human body by surgery (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002440

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 34(2)(a)(i) of the PCT and Rule 67.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ¹ C12N5/10, A61K35/28, A61K35/407, A61P1/16, A61P43/00 C12N15/54		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ¹ C12N5/10, A61K35/28, A61K35/407, A61P1/16, A61P43/00 C12N15/54		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), PUBMED		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	ALISON M. R. <i>et al.</i> , Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells, Nature (2000), Vol. 406, p. 257	10, 12, 13
X	PETERSEN B. E. <i>et al.</i> , Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Ocal Cells, Science (1999), Vol. 284, p. 1168-1170	12, 13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 07. 04. 2004	国際調査報告の発送日 27. 4. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇	4 B 9 4 5 3
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	TUAN R. S. <i>et al.</i> , Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, Arthritis Research and Therapy (2002), Vol. 5, No. 1, p. 32-45	12, 13
X	BARRY F. P. <i>et al.</i> , Biology and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cellss, Birth Defects Research Part C (2003-Aug-25), Vol. 69, p. 250-256	14

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-9, 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲1-9, 11に係る発明は、間葉系細胞を慢性の肝障害を起こした哺乳動物に移植する方法に係り、哺乳動物として人間を包含しているから、人間の手術方法又は治療方法に該当する。よって、特許協力条約第34条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則67.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が国際予備審査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

明 細 書

間葉系幹細胞の肝細胞への分化方法及び人工ヒト肝臓細胞

技術分野

本発明は、間葉系細胞の肝細胞への分化技術に関する。本発明は、更に、肝障害を受けた人を含む動物に対する、肝臓再生医療技術に関する。

背景技術

肝臓は、人体の生化学工場とも呼ばれ、体内で栄養に関係深い中間代謝、胆汁生成、血液成分の生成・変換、解毒等多様な生化学機能を持つ、重要な臓器である。

ところが、アルコール、ウイルス、薬物、又は自己免疫疾患等により肝臓に障害が起きると、肝炎、更に肝硬変となり、時に重大な結果を招く。

例えば、アルコール性肝障害では、アルコール性飲料の慢性過剰摂取によって肝臓の細胞に障害が起き、脂肪肝、アルコール性肝炎、さらに終末的な肝硬変と進行する。1日に摂取するアルコール量が60～80g以上あると、脂肪肝が発生する可能性が高く、1日あたり100～120g以上のアルコールを10年以上摂取すると肝硬変が発生するといわれている。

従来の肝障害治療においては、(1)肝障害の原因となるアルコールなどの毒物を排除する、(2)ビタミン等の補給により肝細胞の自然再生を待つ、(3)薬剤による治療としては、(i)グリチルリチン製剤(肝臓の働きを守る)、(ii)小柴胡湯(肝臓の炎症軽減、肝機能改善)、(iii)胆汁酸製剤(胆石や胆汁鬱滞による肝障害に有用)、(4)ウイルス性肝炎への治療薬としては、(i)インターフェロン、(ii)レボトール(抗ウイルス薬、インターフェロンとの併用：ウイルス量の多いC型慢性肝炎用)、(iii)ラミブジン(抗ウイルス薬、B型肝炎用、DNAポリメラーゼ阻害剤)、及び(5)生体肝移植などの方法がある。

また、アルカリフォスファターゼ陽性ラット幹細胞様セルラインをインビトロで肝細胞系統に分化させたことが非特許文献1に、成人多能細胞からの肝細胞へ

の分化が非特許文献 2 に報告されている。

さらに、分化誘導剤を用いて、骨髓細胞を肝実質細胞に分化させることについては、特許文献 1 に記載されている。

特許文献 1 特開 2002-78482 号

非特許文献 1 Stem Cells Vol. 21, p. 428-436

非特許文献 2 The Journal of Clinical Investigation Vol. 109,
p. 1291-1302

発明の開示

肝臓治療の薬物療法は、対症療法にすぎず、十分ではなく、他方、細胞移植治療に必要な、肝細胞及びMAPC（多能性成人前駆細胞：Multipotent adult progenitor cell）は、樹立化が困難である。

そこで、増殖手法が確立している間葉系幹細胞、特に、骨髓由来の間葉系幹細胞であるストローマ細胞を用いて、肝細胞に分化させ、肝障害の肝細胞移植治療法に役立つ肝細胞を調製する手段を提供することを課題としている。

間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を、薬剤投与を継続することにより慢性の肝障害を起こした哺乳動物、例えば、ラットの肝臓に移植することで、肝細胞、成熟肝細胞に分化することを見出し、間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞から成熟肝細胞へ分化せせる手段を開発した。

本件発明によれば、十分量入手可能な、間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を用いて、成熟型の肝細胞を調製することができる。これにより、例えば、個人から調製した間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞から肝細胞を分化させ、個人別の肝細胞遺伝子プロファイルが作成でき、テーラーメイド医療に役立てることもできる。また、肝細胞を多量に調製できるので、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスの増殖機構の分析、更には、抗ウイルス剤の作用機序の解析にも用いることができる。更に、従来得られなかったヒト正常成熟肝細胞が多量に得られるので、薬剤スクリーニング、薬剤毒性試験に用いることもできる。又更に、分離され、回収されたヒト肝細胞を用いて、肝不全・先天的代謝肝疾患者に移植する細胞治療若しくは人工肝臓の製造にも用いることができる。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-303229 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、ヒト間葉系幹細胞の調製

図 2 は、慢性肝障害を引き起こすアシルアルコールの投与方法

図 3 は、ヒト間葉系幹細胞の移植後 1 4 日目の抗体染色

図 4 は、ヒト間葉系幹細胞の移植後 2 8 日目の抗体染色

図 5 は、ヒト間葉系幹細胞を移植したラット肝臓中におけるヒトアルブミンの発現

図 6 は、ヒト間葉系幹細胞を移植したラット肝臓中におけるヒトアルファフィトプロテインの発現

図 7 は、ヒトアルブミンの生産量

図 8 は、ヒト間葉系幹細胞、ヒト CD 3 4 + 細胞又は非間葉系細胞／非 CD 3 4 + 細胞をアシルアルコール処理を 1 回又は継続的行った場合の、ヒト肝細胞への分化の有無

図 9 は、TERT 導入ヒト間葉系肝細胞 (MSC) の肝分化 (TERT 導入 MSC の肝分化)

発明を実施するための最良の形態

本件発明は、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell ; MSC とも言う)、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を、薬剤投与を継続することにより慢性の肝障害を起こした哺乳動物に移植することで、肝細胞、成熟肝細胞に分化させる、間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞の肝細胞への分化方法を提供する。

本発明では、また、間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を、急性の肝障害を起こした哺乳動物に移植し、移植後に肝障害性薬剤を継続的に投与することにより、肝障害を慢性化させると共に、移植した間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を成熟肝細胞に分化させる方法を提供する。

[間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞、間葉系細胞]

間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞としては、任意の哺乳類由来の

間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を用いることができるが、好適には、ヒト又は、実験動物として常用される、マウス、ラット、サルなどが挙げられる。

間葉系幹細胞としては、例えば、骨髓、末梢血、皮膚、毛根、筋組織、子宮内膜、血液、臍帯血、更には、種々の組織の初期培養物から得ることができる幹細胞を用いることができる。また、ES細胞やテラトーマ細胞からも間葉系幹細胞が分離できることが知られている。ここで、幹細胞とは、全能性を有する全ての細胞に分化できる全能性幹細胞や、胎児性幹細胞のように三胚葉の系統には分化できるが胚外栄養膜細胞への分化は限定的である pluripotency である幹細胞、更には、ある組織の多くの細胞に分化することができる多能性幹細胞などがあるが、間葉系幹細胞は、pluripotent であると考えられている。

間葉系幹細胞として、好適には、骨髓の初期培養を行い、カルチャーディッシュの底面に付着した間質細胞から取得する幹細胞を用いることができる。

間葉系細胞の前駆細胞とは、間葉系幹細胞から分化し、間葉系細胞への分化の途上にある細胞のことを意味する。

間葉系細胞は、間葉系幹細胞の分化により生じ、幹細胞のように多方面に分化する能力はないが、ある方向への分化能力と増殖能力を有している細胞である。正常の状態ではG 0 期に止まっているが、刺激によりG 1 期（分裂開始）に移行できる細胞である。間葉系細胞は、例えば、ストローマ細胞、ストローマ細胞の性質を有する細胞も包含している。間葉系細胞は、皮下組織、肺、肝等あらゆる臓器に存在しており、骨、軟骨、脂肪、腱、骨格筋、骨髄間質と言った間葉系組織に存在している。

更に、本件発明においては、不死化遺伝子、例えば、テロメラーゼ又はテロメラーゼの発現又は活性を調節する遺伝子、好適には、ヒトテロメラーゼ又はヒトテロメラーゼ触媒活性サブユニット（hTERT）を用いて、不死化した上記間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を用いることができる。

不死化遺伝子を、ストローマ細胞等、間葉系幹細胞等への導入方法としては、公知の種々の方法を用いることができるが、例えば、不死化遺伝子をプラスミドベクターに組み込み、当該ベクターをカルシウムーリン酸の存在下でストローマ

細胞のような間葉系細胞、間葉系幹細胞等に導入して、形質転換する方法、或いは不死化遺伝子をリポソームの様なベシクルとともに、間葉系細胞又は間葉系幹細胞に接触させ導入する方法、更に、不死化遺伝子の存在下でエレクトロポレーションにより導入する方法、又は不死化遺伝子を各種ウイルスベクターに組み込み、間葉系細胞若しくは間葉系幹細胞等に感染させて導入する方法などを用いることができる。

ウイルスベクターを用いる導入方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、又はアデノ随伴ウイルスを用いる方法があり、レトロウイルスベクターとしては、MoMLV ウイルスを用いる方法などがある。好適には、p B a b e ベクターを用いることができる。

更に、不死化した細胞をヒトの治療に用いる場合、不死化遺伝子などの外来遺伝子はできるだけ除去しておいた方が安全性が高いと考えられ、既に確立した技術により、細胞に導入した不死化遺伝子を除去することができる。例えば、好適には、不死化遺伝子が loxP 配列または loxP 様配列にはさまれて、Cre リコンビナーゼなどのリコンビナーゼ処理により特異的に除去する手法を用いることができる。

ヒト間葉系幹細胞としては、好適には、骨髓由来の間葉系幹細胞を用いることができる。

[移植対象動物、慢性肝障害手段]

以下、間葉系幹細胞について説明するが、間葉系前駆細胞、間葉系細胞を用いても同様に、肝細胞に分化させることができる。

間葉系幹細胞の肝細胞への分化に有効な環境を与える慢性肝障害組織を提供する、哺乳動物（以下移植対象動物と呼ぶ）としては、種々の実験動物を用いることができるが、例えば、好適には、マウス、SCID マウス、ラット等、特に好適には、SD ラットを用いることができる。なお、ラットに関しては、なるべく週齢の若いもの、例えば、4 週から 6 週齢のものが好適である。

肝障害性薬剤としては、肝障害を与える種々の薬物を用いることができ、例えば、choline deficiency (CD) ethionine、galactosamine、Dimethylnitrosamine (DMN)、Jo2 抗体（抗 Fas 抗体；アポトーシス誘導）が肝臓障害剤として知られ

ており、好適には、アリルアルコール (Allyl Alcohol)、四塩化炭素 (CCl₄)、四塩化炭素 (CCl₄) 及び 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を組み合わせて、又は肝部分切除し 2-AAF を用いることができ、特に好適には、アリルアルコール (Allyl Alcohol) 用いることが望ましい。アリルアルコールは、特に門脈周囲の肝細胞をネクロシスにより傷害する効果がある。

間葉系幹細胞の由来哺乳動物と、移植対象哺乳動物とが同じ動物でない場合は、移植における免疫反応の低減のために、免疫抑制剤を予め、好適には、間葉系幹細胞の移植 1 ～ 2 日前に、移植対象動物に投与することが望ましい。

移植対象動物への移植方法としては、例えば、間葉系細胞含有溶液を上記対象動物の肝臓に局部注射、門脈内注射、尾静脈注射を採用することができる。

肝障害剤により肝障害を慢性化させる場合、間葉系幹細胞の移植時期としては、肝障害性薬剤の影響があるので、早くとも最初の肝障害性薬剤を対象動物に投与後 24 時間後から 3 日以内に、好適には、1 日後に移植することができる。

なお、既に慢性の肝障害を有する肝臓、例えば、ウイルソン病肝硬変モデルである LEC ラットや高チロシン血症による肝障害をきたす FAH^{-/-}マウスの肝臓に移植することもできる。

移植対象動物において、肝障害を慢性化させる手段としては、間葉系幹細胞を移植対象動物に移植後、肝障害性薬剤の投与を続けて肝障害を慢性化する方法がある。

肝障害性薬剤の投与量としては、第一回目の投与は、肝臓に急性に障害を与えるが、動物の生存に影響しない程度に十分な程度の量を選択することができ、例えば、アリルアルコールをラットに用いる場合は、0.5 mmol / Kg ～ 0.7 mmol / Kg 程度、好適には、0.6 mmol / Kg 程度の量を採用することができる。第 2 回目以降の投与は、肝障害性薬剤が肝障害を慢性化するために十分な量とすることができ、例えば、アリルアルコールを用いる場合は、0.3 mmol / Kg とすることができ、

肝障害性薬剤の投与形態としては、その薬剤により好適な投与方法を選択することができるが、例えば、経口投与、静脈注射、腹腔注射によることができ、アリルアルコールをラットに投与する場合は、好適には腹腔注射によることができ

る。

肝障害性薬剤の投与期間は、肝障害を慢性化させるのに十分な期間投与する。好適には、間葉系幹細胞が成熟肝細胞に分化するのに必要な期間、例えば、2週間～3月間、好適には3～5週間、更に好適には、4週間投与数することができる。例えば、肝障害薬剤としてアリルアルコールを用い、ヒト間葉系幹細胞をラットに移植する場合には、0.3 mmol/kgの腹腔内注射を、週3回、1月間続けることができる。

[肝細胞への分化の確認]

未分化肝細胞（未熟肝細胞）のマーカー（標識）としては、GST-P、サイトケラチン19、 α -フェトプロテインがあり、これらマーカーの検出には、これらマーカーに対する抗体、又はマーカーをコードする遺伝子特異的なプライマー若しくはプローブを用いることができる。又、更に、 γ -GTP染色により、未分化肝細胞（未熟肝細胞）を分別することもできる。

成熟肝細胞のマーカー（標識）としては、アルブミン、 α 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、CK18、AGPR等があり、これらマーカーは、該マーカーに対する抗体又マーカーをコードする遺伝子特異的なプライマー若しくはプローブを用いて検出することができる。

なお、抗アルブミン抗体、抗AFP（ α フィトプロテイン）抗体、抗CK19抗体（CKはサイトケラチン（Cytokeratin）の略。以下同じ。）、抗CK18抗体、抗AGPR抗体（AGPRは、アシアログリコプロテインレセプター（asialoglycoprotein receptor）の略。以下同じ。）等との反応性の比較により、未分化、成熟の検討ができる。

更に、間葉系幹細胞が由来する動物とは異なる動物の肝臓へ、間葉系幹細胞を移植した場合、例えば、ヒト間葉系幹細胞をラットの肝障害肝臓へ移植する場合は、間葉系細胞由来の動物特異的捏上記成熟肝細胞マーカー特異的な抗体、ヒトアルブミン特異的な抗体を用いて、免疫染色法、免疫酵素染色法、サンドイッチ抗体法などの方法により確認することができる。

又マーカー特異的なプライマーを用いる場合は、遺伝子増幅法、例えば、PCRを用いることができる。

〔分化した肝細胞の回収〕

例えば、実験動物から肝臓を摘出し、肝細胞に分離し、間葉系細胞が由来する動物に特異的であつ成熟肝細胞特異的である蛍光標識した抗体や細胞表面マーカー（HLA など）に対する抗体で処理し、蛍光細胞分別機（FACS）で、間葉系幹細胞から分化した成熟肝細胞を単離することができる。

ヒトテロメラーゼを導入して、不死化した TERT 導入 MSC を上述の方法で肝に分化させ、灌流分離したものを培養する。ラット由来の肝細胞は通常一週間程度で死滅することから、残存した細胞が間葉系幹細胞から分化した成熟肝細胞である。これを適当な培地で培養増殖させる。

〔分化した肝細胞の利用〕

個人から調製した間葉系幹細胞から分化させた肝細胞を回収し、個人別の肝細胞遺伝子プロファイルが作成でき、テイラーメイド医療に役立てることもできる。また、肝細胞を多量に調製できるので、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスの増殖機構の分析、更には、抗ウイルス剤の作用機序の解析にも用いることができる。更に、従来得られなかったヒト正常成熟肝細胞が多量に得られるので、薬剤スクリーニング、薬剤毒性試験に用いることもできる。

又更に、分離され、回収されたヒト肝細胞を用いて、肝不全・先天的代謝肝疾患患者に移植する細胞治療若しくは人工肝臓の製造にも用いることができる。

〔間葉系幹細胞を用いた細胞治療剤〕

又、間葉系幹細胞は、慢性肝炎の細胞治療に、適切な担体と共に、肝臓疾患部に直接投与する、細胞治療剤として用いることもできる。

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、実施例は本発明の一態様にすぎず、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

〔間葉系幹細胞から肝細胞への分化〕

1-1 間葉系幹細胞（MSC）：

健康成人の腸骨より骨髓穿刺を行い、比重遠心法により単核球を採取、10%非働化胎児ウシ血清含有 DMEM にて一晚培養。翌日より付着細胞（adherent cell）を

培養する。2 週後に T-E (トリプシン-E D T A) にて細胞を回収したものを初代間葉系幹細胞とし凍結保存した。初代培養の間葉系幹細胞は、10%非働化胎児ウシ血清含有 DMEM で継代培養し、初代培養から PD 6 から 9 (6 から 9 回の世代分裂 population doubling を経た時期) で、以下の実験に使用した (図 1)。

1-2 実験動物：

日本チャールズリバーより購入した Spragne-Dawley (SD) ラット (5 週齢，雌もしくは雄) を使用した。

1-3 肝障害モデルと MSC 投与法：

MSC 投与前々日 (day-1) よりサイクロスポリン A、(CyA、サンディミュン Sandimmun: ノバルティスファーマより購入) 10mg/kg/day で腹腔内投与を開始した。さらに翌日 (day-0) 肝障害を起こすために Yavorkovsky ら (Hepatology 1995;21:1702-1712) の報告に基づき allyl alcohol (AA) (0.62 mmol/kg) を腹腔内投与した。翌々日 (day 1)、 2×10^6 細胞/300ul に調整した MSC (間葉系幹細胞) を 23G 注射器を用いてラット肝臓に直接局所注入した。その後、AA (0.3mmol/kg) 週 3 回投与による慢性肝障害を行った (図 2)。

2 肝細胞への分化の確認

ヒト肝細胞への分化の確認は、1) ヒト特異的な肝特異マーカーによる染色すること、2) ヒト特異的なアルブミン (Alb) 及びアルファフェトプロテイン (AFP) の mRNA を検出すること、並びに 3) ヒト特異的なアルブミン蛋白の産生を ELISA 法での検出により、行った。

2-1 ヒト肝臓特異マーカーによる染色：

MSC 投与から 14 日目 (day 14) と 28 日目 (day 28) に屠殺し、肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し OTC compound で包埋後、凍結切片 ($6 \mu\text{m}$) を作製した。これらを予めラット肝臓組織と交差反応しない事を確かめた抗ヒト Alb (アルブミン) 抗体 (Sigma 社、A6684)、抗ヒト AFP 抗体 (Sigma 社、A8452)、抗ヒト CK19 抗体 (Sigma 社、C6930)、抗ヒト CK18 抗体 (PROGEN 社、RCK106)、AGPR 抗体 (Kohgo ら、Hybridoma 1993; 12. 591-598) とコントロール抗体で染色を用いて免疫染色した。

図 3 に MSC 移植後 14 目の結果を 400 倍の倍率で示す。図 3 の上段，中段に

示すように、径 20-25 μm 程度の抗ヒト AFP 抗体、抗ヒト CK19 抗体、抗ヒト Alb 抗体、抗ヒト CK18 抗体、又は抗 AGPR 抗体の陽性細胞が同一切片上で 50 から 80 個程度のクラスター状に認められた。コントロール抗体では染色は認められなかった。下段に示す蛍光免疫染色では、赤で示されるローダミン (Rodamine) 標識抗ヒト AFP 抗体 (左側) と緑で示される FITC 標識抗ヒト Alb 抗体 (中央) で染色され、右側に示すこれらの重ね合わせ (マージ) 像では、黄色に見えることから、これらの移植 MSC は AFP と Alb を発現しているものと考えられた。これらの染色パターンは比較的未分化なヒト肝細胞であることを示している。

図 4 に MSC 移植後 28 日後の免疫染色の結果を示す。14 日後と同様に 400 倍の倍率であるが、上段、中段に示すように、径 25-30 μm の抗ヒト Alb 抗体、抗ヒト CK18 抗体、又は AGPR 抗体の陽性細胞が同一切片上で 300 個以上のクラスター状に認められた。一方、抗ヒト AFP 抗体、又は抗ヒト CK19 抗体の陽性細胞はわずかに散見されるのみであった。下段に示す蛍光免疫染色では、同様に赤で示される Rodamine 標識抗ヒト AFP 抗体陽性細胞が一部に認められ FITC 標識抗ヒト Alb 抗体では全体に染色された (中央)。右側に示すマージ像では、AFP 抗体陽性細胞部分は黄色に見えることから、これらの移植 MSC のほとんどは Alb を発現しているが一部に AFP の発現も残存しているものと考えられた。これらの染色パターンはヒト成熟肝細胞を示すものである。

2-2 ヒト特異的なアルブミン (Alb), ならびにアルファフェトプロテイン (AFP) の mRNA の検出

肝組織から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を調製した。この cDNA を鋳型にして、ヒト特異的 Alb、AFP について、対応するプライマーを用いて、PCR を行い、バンドの増幅をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

プライマー配列としては、ヒトアルブミン用のプライマーセンス鎖 (Hu-Albumin (S)) として 5'-cttcgtctgccaaacagagactca-3' (24mer) を、ヒトアルブミン用プライマーアンチセンス鎖 (Hu-Albumin (AS)) として 5'-acagagtaatcaggatgccttcttg-3' (25mer) を、ヒトアルファフェトプロテイン用プライマーセンス鎖 (Hu-AFP (S)) として 5'-ttggagaagtacggacattcagact-3' (25mer) を、及びヒトアルファフェトプロテイン用プライマーアンチセンス鎖

(Hu-AFP (AS)) として 5'-gactcagtttagtaacagttatggct-3' (26mer) を用いた。DNA 試料は 94 度で 5 分間変性し、94 度で 1 分 (変性)、65 度で 1 分 (アニーリング)、更に 72 度で 30 秒 (伸長) からなるサイクルを 40 サイクルし増幅した。増幅産物は、2.5% アガロースゲル電気泳動上でエチジウムブロマイド染色で Alb は 482 bp, AFP は 420bp のバンドとして可視化される (図 5, 6)。

Alb の発現を検討した図 5 では、1 ; 肝癌細胞である HepG2 細胞 (ポジティブコントロール)、2 ; ラット肝臓 (ネガティブコントロール)、3 ; MSC を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、4 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、5 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、6 ; MSC を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、7 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、及び 8 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、を示している。MSC 投与後 14 日目 (Day 14) 及び 28 日目 (Day 28) では MSC を肝局注後、週三回の AA 投与したもののみヒト Alb のバンドが示された。

AFP の発現を検討した図 6 では、1 ; 肝癌細胞である HepG2 細胞 (ポジティブコントロール)、2 ; ラット胎児肝臓 (ネガティブコントロール)、3 ; MSC を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、4 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、5 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、6 ; MSC を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、7 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、及び 8 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、を示している。Day 14 では MSC を肝局注後、週三回の AA 投与したもののみヒト AFP のバンドが示されたが、Day 28 では認めなかった。

2-3 ヒト特異的なアルブミン蛋白の産生を ELISA 法で検出

次に移植ヒト MSC が実際にヒト Alb を産生しているか、すなわち機能しているか (functional なものであるか) どうかを確認するため MSC 局注部の肝組織 10mg を採取し、そのホモジェネイトを用いてヒト特異的な Alb 蛋白を検出可能なヒト

アルブミン ELISA kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas) で検討した。

Alb の産生を検討した図 7 では、右から順に 1 ; ヒト肝組織 (ポジティブコントロール)、2 ; ラット肝臓 (ネガティブコントロール)、3 ; MSC を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、4 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、5 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、週三回の AA 投与したもの、6 ; MSC を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、7 ; コントロールとした CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、及び 8 ; コントロールとした MSC と CD34 を除いた Non-MSC/non-CD34+細胞を肝局注後、一度のみ AA 投与したもの、を示している。

MSC 移植 AA 持続投与肝障害ラットでは移植後 14 日目にヒト Alb の産生が 4 ng/mg of tissue/ml, 移植後 28 日後の肝組織中に 7. 6 ng/mg of tissue/ml と他のコントロールと比較し有意に増加しヒト肝組織に近いヒト Alb の産生を確認した。

3. 結論

アリルアルコール (AA) を用いた肝障害においては、急性肝炎群ではなく AA を週 3 回投与する慢性肝障害モデルにおいて MSC の肝分化が示された。このことは AA による持続肝障害が MSC の肝臓への分化誘導に好適な環境であることを示すものと考えられた。

他方 MSC 以外の骨髓分画を局注した系ではいずれの肝障害モデルにおいても肝への分化が認められなかった。このことは、これまでの報告 (Wang X ら. Am J Pathol 2002;161:565-574.) で示されているように、HSC (造血幹細胞: Hematopoietic Stem Cell) や骨髓細胞を用いた肝分化には 放射線 (radiation) による骨髓細胞の除去 (bone marrow ablation) を行い移植細胞の骨髓生着をさせることが必須であることを裏付ける結果であると考えられる。

実施例 2

TERT 導入 MSC の肝分化

kawano ら (Blood. 2003 ;101, 532-40) の方法に基づき、以下の参考例 1 に記載の方法で、調製した hTERT を導入した MSC (TERT-MSC) を作製し、実施例 1 の方法で肝に局注後 28 日後に観察した。

その結果、図 9 に示されるように、正常のラット肝組織中にヒトアルブミンの発現を呈する細胞が確認され、成熟肝細胞に分化したものと考えられた。

実施例 3

間葉性幹細胞由来肝細胞様細胞の灌流による分離

(1) hTERT 遺伝子の導入された間葉性幹細胞由来 (hTERT-MS C) を肝臓内に局注したラット (実施例 2) を、局注後 28 日に深麻酔下に剃毛後開腹し、門脈より 37℃ EGTA 液 (Hanks 液 500mL + HEPES 1.19g + EGTA 0.1g にて調整) を灌流する。肝臓の腫大を確認した後、肝の上下の下大静脈を切断し、10mL/min の速度にて 10 分間灌流する。次に、37℃ コラゲナーゼ液 (Hanks 液 500mL + CaCl₂/2H₂O 0.235g + HEPES 1.19g + collagenase (collagenase Yakult) 100mg (100U/mL) を 10mL/min の速度にて 10 分間灌流する。肝表面に白点が出現していることを確認したのち、hTERT-MS C を局注した部位を鉗子にて切断し、冷却した Hanks 液内にて摂子および鉗子を用いて細切し、100 μ m および 70 μ m フィルターにて濾過する。続いて、50g にて 1 分間遠心し、上清を除去後、再び冷却した Hanks 液内にて懸濁し、50g にて 1 分間遠心する。これを 3 回繰り返したのち細胞数を数える。その結果約 2×10^8 個の細胞が回収される。

(2) 間葉性幹細胞由来肝細胞様細胞の培養

続いて、上記の灌流によって得られた細胞を培養する。 1.4×10^4 cell/cm² にて L15 medium (0.2% BSA および 50mg/L ゲンタマイシン, 100nM デキサメタゾン および 0.5mg/L インスリンを加えた L15 500mL) に接種する。3 時間後に HCM 培地 (HCM BulletKit (宝酒造)) に変え、CO₂ インキュベーター内で 37℃ にて培養する。

Rat 肝細胞は約 1 週間で死滅することから、これを約 1 週間観察しコロニーの形成されたものが hTERT-MS C 由来ヒト肝細胞である。

〔参考例 1〕

hTERT-MS C の調製

1. 間葉系幹細胞の分離 健康成人の腸骨より骨髓穿刺を行い、比重遠心法により単核球を採取、10% 非働化胎児ウシ血清含有 DMEM にて一晚培養。翌日より付着細胞 (adherent cell) を培養する。2 週後に T-E (トリプシン-EDTA) にて細胞を回収したものを初代間葉系幹細胞とし凍結保存した。

2. hTERT 間葉系幹細胞に導入する遺伝子として、ヒトテロメラーゼの触媒活性サブユニット (hTERT) をコードする遺伝子を用いた。hTERT の配列は、例えば、Science 277, p. 955-959 に記載されている。

3. 間葉系幹細胞への遺伝子導入に用いるベクター (図 1)

pBABE-hygro-hTERT (Dr. Robert A Weinberg より供与) は、pBABE-hygro-hTERT は Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 95, pp. 14723-14728 中に記載されているとおり、pCI-Neo-hTERT-HA より PCR にて得た hTERT EcoRV-SalI fragment を pBABE-hygro に cloning したものである。

4. レトロウイルス産生細胞の作製とそれによるウイルスの感染は「別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 遺伝子導入&発現解析実験法 (斎藤 泉 菅野 純夫 編 羊土社)」に準じておこなった (P58-62)。

具体的には、BOSC23 パッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8392-8396, 1993) を用いて、次のように、 Ψ CRIP パッケージング細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543, 1993) を作成した。

4-1. 組み換えレトロウイルスベクター産生細胞の作製

(i) BOSC23 細胞を 10cm dish にトランスフェクションの 18~24 時間前に 5.5×10^6 個播いた。

(i i) $15 \mu\text{g}$ の DNA (レトロウイルスベクター) に OPTI-MEM (Gibco/BRL) を $800 \mu\text{l}$ 静かに加え、攪拌し A 液を調製した。

(i i i) 滅菌されたチューブに OPTI-MEM を $750 \mu\text{l}$ 採り、LIPOFECTAMINE (2mg/ml Gibco/BRL) を $50 \mu\text{l}$ 加えてゆっくり混ぜ B 液を調製した。

(i v) A 液を静かに B 液に混ぜ C 液を調製し、室温で 30~45 分放置した。

(v) BOSC23 細胞を抗生剤、FBS を除いた 37°C の培地で 1 度洗った。

(v i) C 液 (1.6ml) を静かに BOSC23 細胞に加えた。

(v i i) 更に、2.4ml の OPTI-MEM を加えた。

(v i i i) 5 時間、 $5\% \text{CO}_2$ 下でインキュベートした。

(i x) 4ml の 20% 胎児ウシ血清を含む DMEM を加え、1 晩インキュベートした。

(x) 10% 胎児ウシ血清を含む 37°C の培地に換え、同時にパッケージング細胞である Ψ CRIP を 10cm dish に $1 \sim 2 \times 10^6$ 個播いた。

(x i) 24 時間後, BOSC23 細胞の培地を 0.45 または $0.20\mu\text{m}$ のシリンジフィルターで濾過し、 ΨCRIP の培地を 5ml の濾過した培地に交換した。同時にポリブレン (Hexadimethrine Bromide, SIGMA H-9268) を $8\mu\text{g/ml}$ になるように加えた。

(x i i) 4~24 時間培養後、 5ml の培地を加え、さらに一晚培養した。

(x i i i) 薬剤選択を行い、レトロウイルスを産生する ΨCRIP 細胞が作成される。

次に、上記のベクターを、レトロウイルス産生細胞 ($\Psi\text{CRIP/P131}$) で増殖させ、間葉系幹細胞は次のように遺伝子導入 (感染) された。

まず、感染を行う前日に、間葉系幹細胞を $5 \times 10^4 \text{cell} / 10 \text{cm dish}$ となるように播きなおし、レトロウイルスを産生する $\Psi\text{CRIP/P131}$ の培地を 10%ウシ血清含有 DMEM から 12.5% 非働化ウマ血清 12.5% 非働化胎児ウシ血清 / 2-Mercaptoethanol/hydrocortisone 含有 α -MEM の培地に代えて培養する。当日に培養上清を $0.20\mu\text{m}$ フィルターで濾過してポリブレン (polybrene) を最終濃度 $8\mu\text{g/ml}$ になるように加えた。次に上清に産生された組み換えレトロウイルスベクターを間葉系幹細胞に感染させた。4 時間後培養上清を新しい培地に換えてさらに 2 日間培養した。その後、pBABE-hygro-hTERT はハイグロマイシン $100\mu\text{g/ml}$ で 5 日間、薬剤選択を行った。

感染には、レトロウイルスベクターを、(1) コントロール、(2) pBABE-hygro-hTERT ベクターのみで感染させた。

なおこれらのウイルスおよび細胞は、発明者らが保管しており、特許後いつでも分譲できる状態にある。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願の内容をそのまま引用により本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明は、細胞分化、細胞培養、医薬開発、人工臓器開発などの産業に利用できるほか、更には、肝臓再生医療の技術に関する産業分野で利用することができる。

請求の範囲

1. 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を、慢性肝障害組織を用いて肝細胞に分化させる方法。
2. 慢性肝障害組織が、肝細胞障害性薬剤を哺乳動物に長期間投与することにより哺乳動物の肝臓に生じた慢性肝障害組織である、請求項1記載の方法。
3. 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を肝細胞に分化させる、次の(1)から(3)の工程を含む方法。
 - (1) 肝細胞障害性薬剤を哺乳動物に投与する工程
 - (2) 間葉系細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を当該哺乳動物の肝臓に移植する工程
 - (3) 肝細胞障害性薬剤を継続的に当該哺乳動物に投与する工程
4. 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞がヒト由来の間葉系幹細胞である請求項1～3いずれか1項記載の方法。
5. 間葉系幹細胞がヒト由来の間葉系幹細胞である請求項1～4いずれか1項記載の方法。
6. 間葉系幹細胞がhTERT（ヒトテロメラーゼの触媒活性サブユニット）を導入した間葉系幹細胞である請求項1～5いずれか1項記載の方法。
7. 肝細胞障害性薬剤が、アリルアルコールである請求項2～6いずれか1項記載の方法。
8. 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞の移植前に免疫抑制剤を投与する請求項2～7いずれか1項記載の方法。
9. 間葉系細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を肝臓に局部注射する請求項2～8いずれか1項記載の方法。
10. 哺乳動物がラットである請求項2～9いずれか1項記載の方法。
11. 請求項1～10いずれか1項記載の方法で分化された肝細胞を間葉系幹細胞由来の肝細胞に特異的標識により、分別して回収する方法。
12. 請求項1～10いずれか1項記載の方法により分化された肝細胞。
13. 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞から分化した肝細胞を

有効成分として含む肝障害治療剤。

1 4 . 間葉系幹細胞、間葉系前駆細胞又は間葉系細胞を有効成分として含む肝障害治療剤。

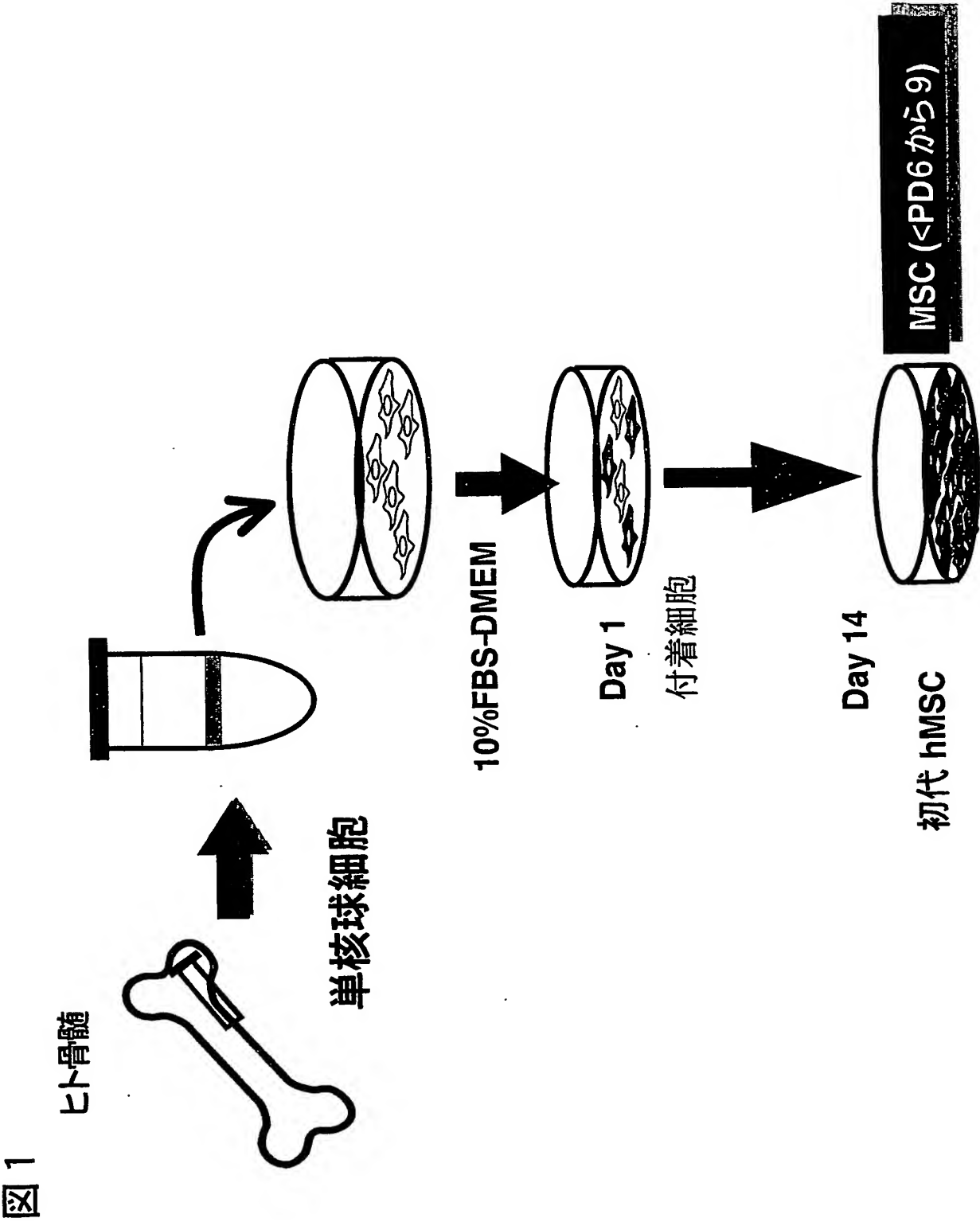


図 2

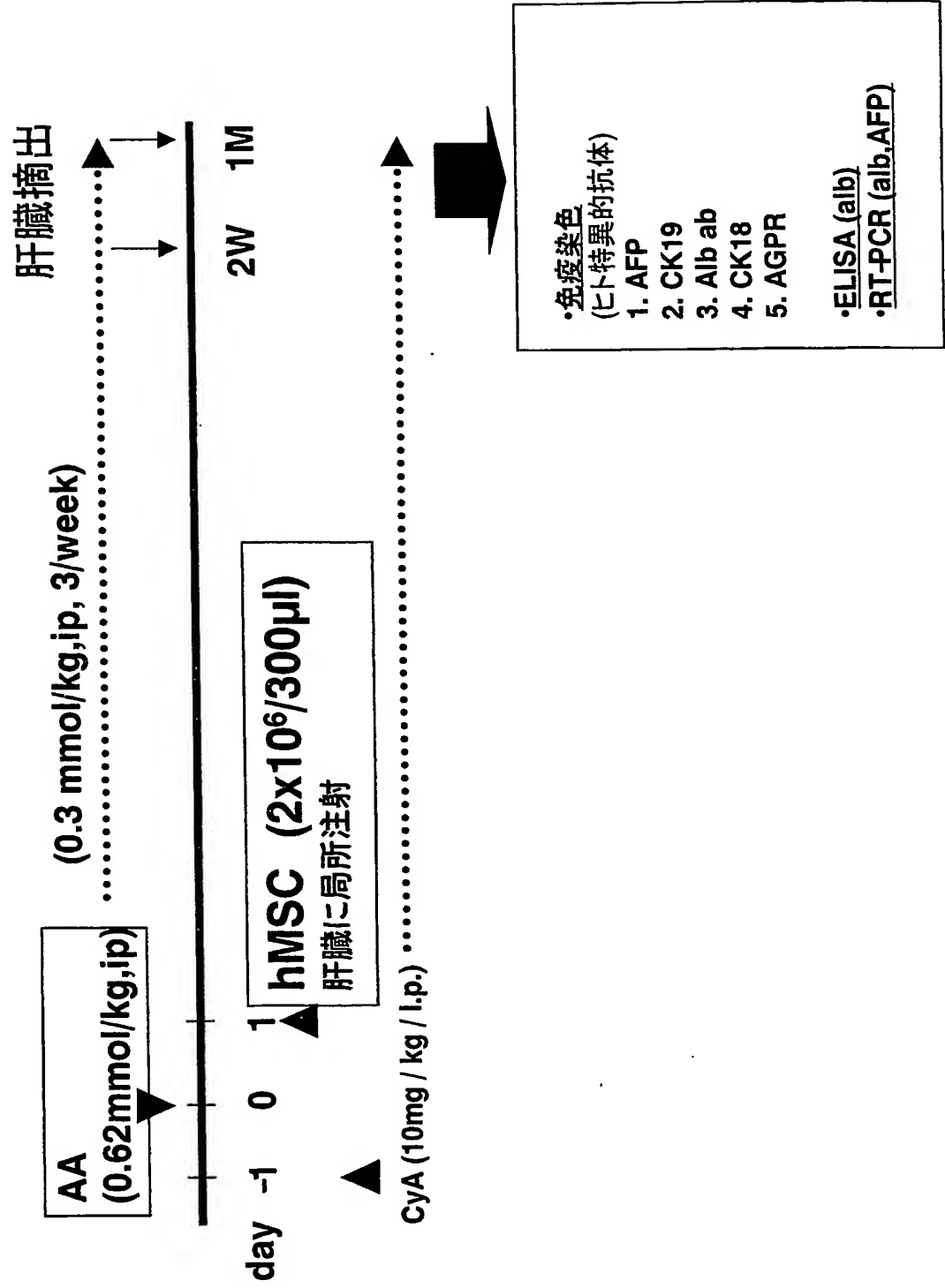


図 3

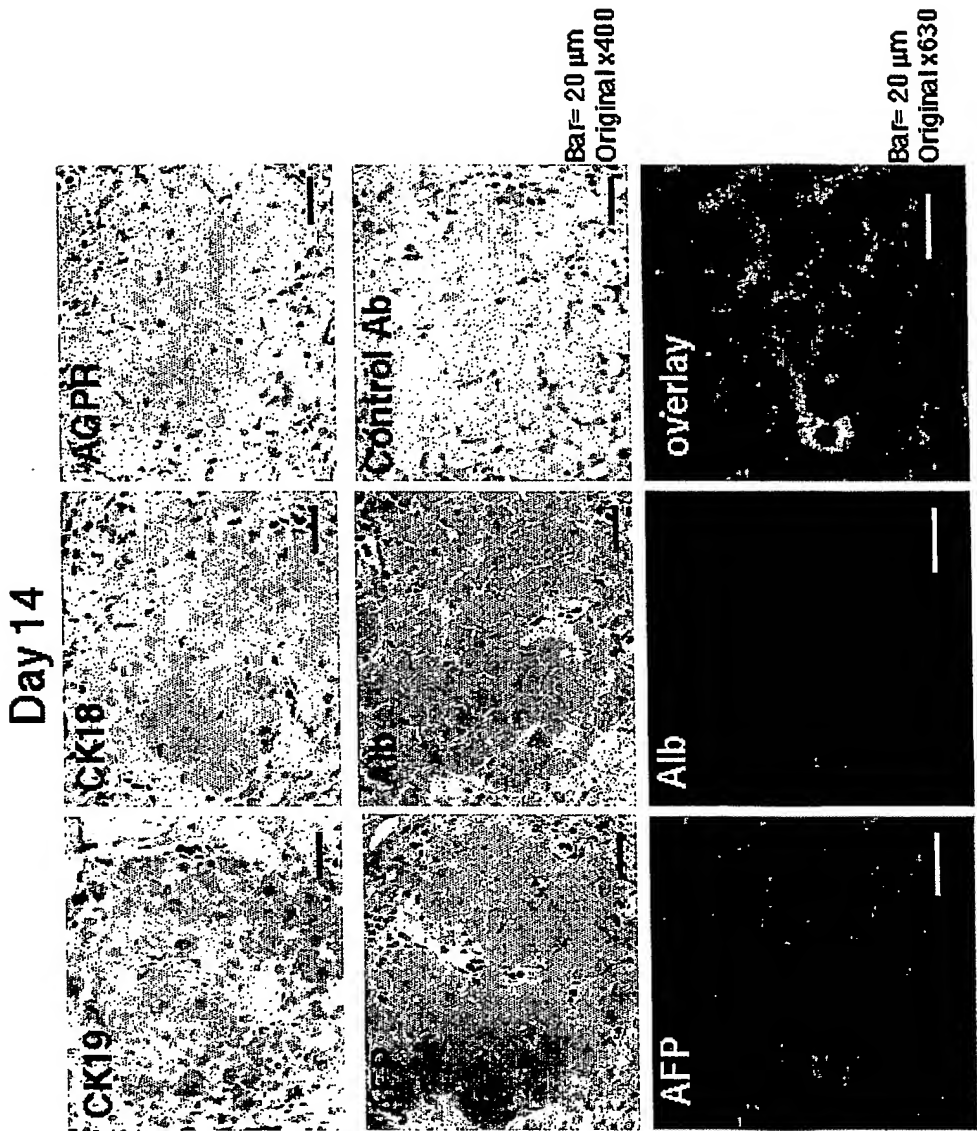


図 4

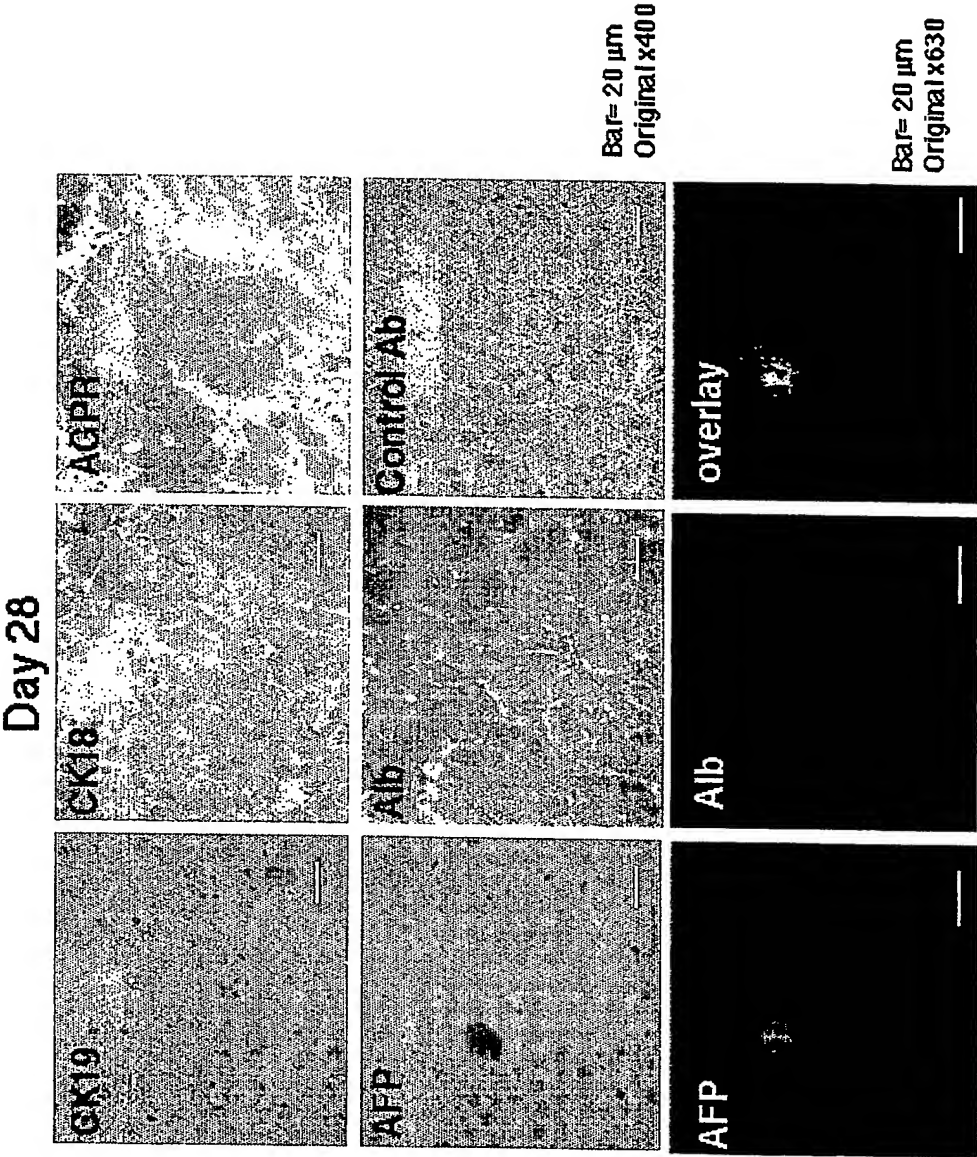
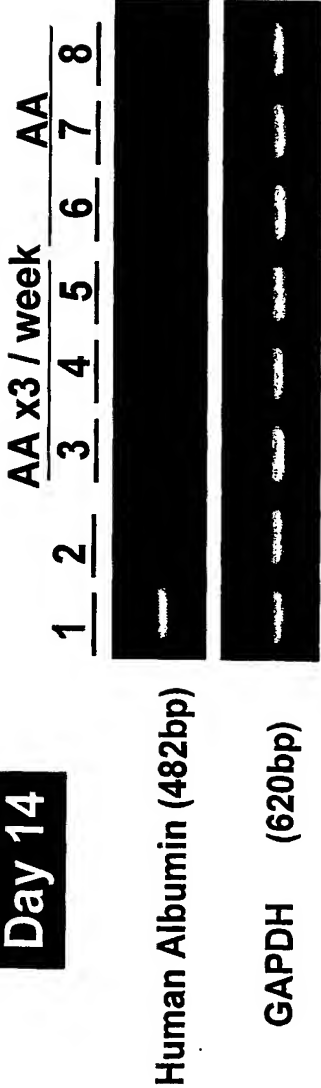
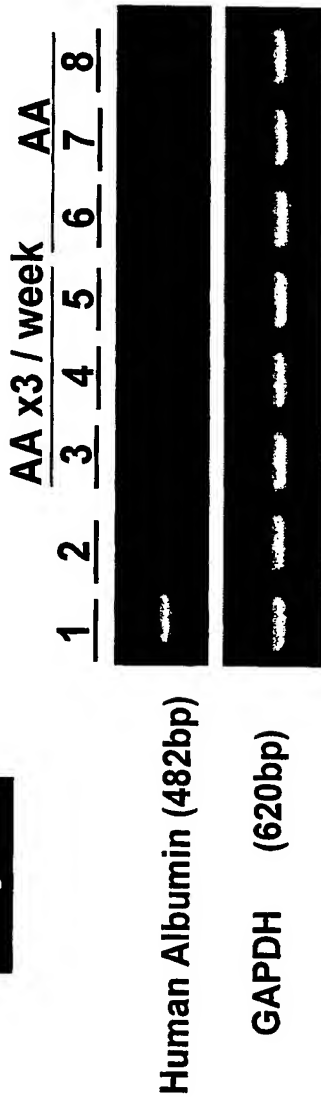


図 5

Day 14



Day 28



1: ヒト肝臓
2: ラット肝臓
3及び6: ヒト MSC移植
4及び7: ヒトCD34+移植
5及び8: 非MSC/非-CD34+細胞移植

図6

Day 14

AA x3 / week								AA
1	2	3	4	5	6	7	8	



Human AFP (420bp)



GAPDH (620bp)

1 :HepG2細胞
2 : ラット胎生肝
3及び6: ヒト MSC移植
4及び7 : ヒトCD34+移植
5及び8: 非MSC/非-CD34+細胞移植

Day 28

AA x3 / week								AA
1	2	3	4	5	6	7	8	



Human AFP (420bp)



GAPDH (620bp)

図7

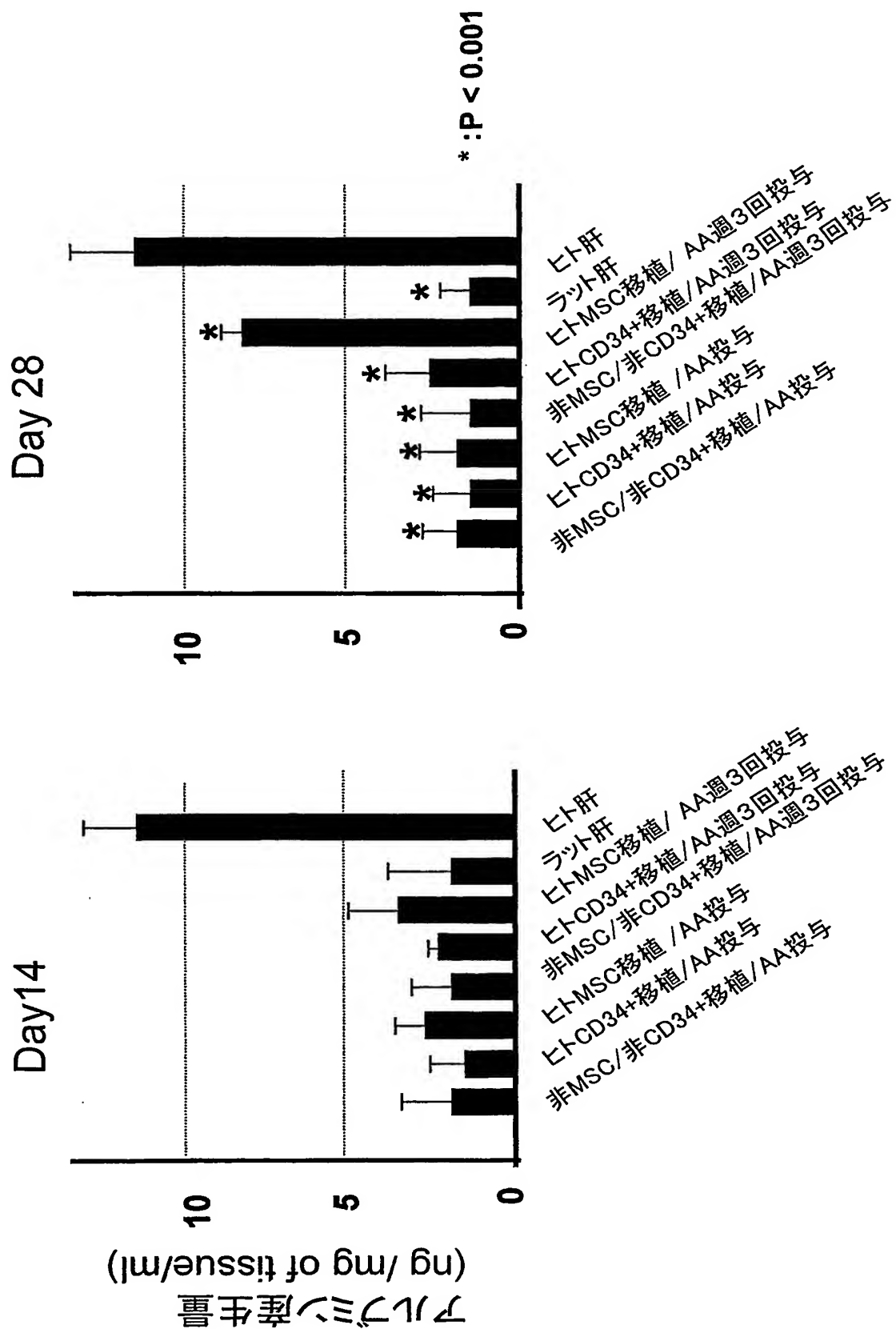
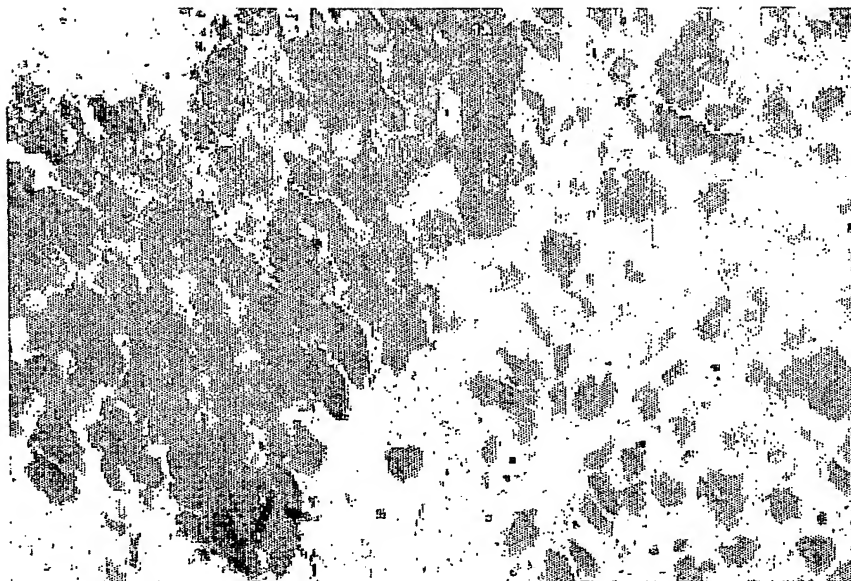


図 8

		アリルアルコール投与 (急性肝炎)						持続的アリルアルコール投与 (慢性肝炎)					
		ヒト MSC 移植		ヒトCD34+ 移植		非MSC/非-CD34+ 細胞移植		ヒト MSC 移植		ヒトCD34+ 移植		非MSC/非-CD34+ 細胞移植	
観察期間		14	28	14	28	14	28	14	28	14	28	14	28
AFP		-	-	-	-	-	-	+	+/ -	-	-	-	-
CK-19		-	-	-	-	-	-	+	+/ -	-	-	-	-
Alb		-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-
CK-18		-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-
AGPR		-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-
ELISA albumin		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+#	ND	ND	ND	ND
RT-PCR albumin		ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
RT-PCR AFP		ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND

一、染色されない; +/-, 染色細胞をわずかに認める; +, 小クラスターを認める; ++, クラスターを認める; ND, 検出せず
7.6ng/mg of tissue/ml

図 9



x 200 抗ヒトアルブミン染色

SEQUENCE LISTING

<110> Renomedix Institute Inc.

<120> Method of differentiating Mesenchymal Stem cell into hepatocyte and artificial human hepatocyte

<130> PH-2076-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003-303229

<151> 2003-08-27

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 1

cttcgtctgc caaacagaga ctca

24

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

acagagtaat caggatgcct tcttg

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

ttggagaagt acggacattc agact

25

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gactcagttt agtaacagtt atggct

26

PH-2076-PCT

5/7

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 株式会社レノメディクス研究所 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2003年 02月 28日 (28. 02. 2003)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	再生医療-日本再生医療学会雑誌増刊号(第2回日本再生医療学会総会プログラム・抄録)151ページ Po-021
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.